

两面针中木脂素化合物结晶-8 对伤害性疼痛大鼠 c-fos 基因表达的影响*

王希斌¹, 刘华钢², 杨斌², 黄慧学³, 刘丽敏²

(1. 广西医科大学第一附属医院药剂科, 南宁 530021; 2. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 3. 广西中医学院药学院, 南宁 530001)

摘要 目的 研究两面针中木脂素化合物结晶-8(简称结晶-8)对甲醛所致伤害性疼痛大鼠的即早基因(c-fos)表达的影响。方法 SD 雌性大鼠 34 只, 随机分为 5 组: 0.9% 氯化钠溶液组、模型组、阳性对照组(罗通定注射液 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、结晶-8 高剂量($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组各 7 只, 结晶-8 低剂量($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组 6 只。采用免疫组化染色观察疼痛大鼠 c-fos 基因的表达情况。结果 模型组大鼠脑干、下丘脑及脊髓视野中 Fos 阳性颗粒分别为 (20.33 ± 2.63) , (19.28 ± 2.42) , (18.36 ± 5.11) 颗; 结晶-8 高剂量组分别为 (10.76 ± 3.66) , (12.49 ± 2.80) , (6.87 ± 2.10) 颗。结论 结晶-8 的镇痛机制可能与抑制中枢 FOS 蛋白的表达有关。

关键词 两面针; 结晶-8; 镇痛机制; 即早基因

中图分类号 R282.71; R285.5

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)09-1113-04

Effect of the Lignans Compound Crystal-8 from *Zanthoxylum Nitidum* (Roxb.) DC. on C-fos Gene Expression in Rats with Harmful Pain

WANG Xi-bin¹, LIU Hua-gang², YANG Bin², HUANG Hui-xue³, LIU Li-min² (1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. College of Pharmaceutical Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. College of Pharmacy, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China)

ABSTRACT Objective To study the effect of the crystal-8 from *zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. (crystal-8) on the expression of c-fos gene in rats with nociceptive pain caused by formalin. **Methods** A total of 34 female SD rats were randomly divided into 5 groups: the blank control, model control, positive control (rotundine $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), high dose of crystal-8 groups ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 7 rats in each, and 6 rats in the low dose of crystal-8 group ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The expression of c-fos gene in painful rats was detected by using immunohistochemistry. **Results** The positive particles of FOS protein in the brainstem, hypothalamic and spinal cord of the model control group were (20.33 ± 2.63) , (19.28 ± 2.42) , (18.36 ± 5.11) , respectively, those in the high dose of crystal-8 group was (10.76 ± 3.66) , (12.49 ± 2.80) , (6.87 ± 2.10) , respectively. **Conclusion** The mechanism of analgesia by crystal-8 may be related to restraining the FOS protein expression in central nervous tissues.

KEY WORDS *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.); Crystal-8; Analgesia mechanism; c-fos

C-fos 为细胞内快速反应基因, 是一种存在于正常神经元细胞核内的即刻早期基因, 耦联细胞外信息与细胞内靶基因的转录, 形象称之为核内“第三信使”。FOS 蛋白(简称 Fos)是 c-fos 基因的表达产物, 能对外界刺激在数十分钟作出反应。研究表明, Fos 在中枢神经系统的表达与痛觉调控关系密切^[1]。Fos 可以作为神经元活性和生长因子作用的细胞水平和代谢性标

记, 作为伤害性刺激的神经元激活的一个经突触标记来追踪疼痛通路的方法。Fos 是疼痛在分子水平上的标志^[2]。

两面针为芸香科花椒属藤本植物, 资源丰富, 主要分布在浙江、广东、广西等地。本课题前期研究已经证实了两面针中木脂素化合物结晶-8(简称结晶-8)的镇痛作用, 且对疼痛大鼠脑内 β -内啡肽存在影响^[3], 但其对 Fos 的表达影响笔者未见报道。本研究建立动物 0.5% 甲醛伤害性刺激所致的疼痛模型, 采用免疫组化方法, 通过侧脑室注射结晶-8, 以期观察伤害性刺激后 Fos 的变化及结晶-8 对应激反应的中枢内信使分子的变化, 初步揭示其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器 1512 型组织切片机为德国 Leitz 产品, 病理图像分析仪为德国莱卡公司产品。

收稿日期 2012-02-09 修回日期 2012-03-30

基金项目 * 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20050598003)

作者简介 王希斌(1977-), 男, 广西玉林人, 主管药师, 硕士, 主要从事中草药的作用机制研究。电话: 0771-5356154, E-mail: wangxibin006@ yahoo. com. cn。

通讯作者 刘华钢, 女, 博士生导师。电话: 0771-5700208, E-mail: hgliu@ 263. net。

1.2 试剂 注射用结晶-8 乳剂由广西医科大学药学院提供;甲醛溶液(成都市科龙化工试剂厂,批号:0601032);罗通定注射液(广东博罗先锋药业,批号:070801);一抗 c-fos 试剂盒(CHEMICO 公司, LOT NUMBER 0703054750)。

1.3 实验动物 健康 SD 雌性大鼠,体质量 180 ~ 220 g,由广西医科大学实验动物中心提供,合格证号:桂医动字第 23003 号。

1.4 实验动物分组、给药方法及模型的制备 SD 雌性大鼠 34 只,随机分为 5 组。0.9% 氯化钠溶液组:侧脑室注射与药物等体积的 0.9% 氯化钠溶液。参考 DUBUISSON 等^[4]介绍的方法,每只大鼠左足趾皮下注射 5% 甲醛 100 μ L,参考 Mestre 的分级评分法,进行模型的评估,合格动物进行下一步实验。模型组:1 h 后侧脑室注射与药物等体积 0.9% 氯化钠溶液。结晶-8 高剂量组:大鼠左足趾皮下注射 5% 甲醛 100 μ L,1 h 后侧脑室注射结晶-8 制剂(2 mg \cdot kg⁻¹)。低剂量组:大鼠左足趾皮下注射 5% 甲醛 100 μ L,1 h 后侧脑室注射结晶-8 制剂(1 mg \cdot kg⁻¹)。阳性对照组:大鼠左足趾皮下注射 5% 甲醛 100 μ L,1 h 后侧脑室注射罗通定注射液(2 mg \cdot kg⁻¹)。

1.5 取材方法 给药 1 h 后,水合氯醛麻醉大鼠,固定,开胸暴露心脏,主动脉插管,剪开右心耳,迅速用灭菌 0.9% 氯化钠溶液 250 mL 灌注,之后用 4 $^{\circ}$ C 的 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)250 mL 灌注,待完全固定后,断头取脑,脑组织分离出脑干、下丘脑及脊髓,然后将各组织浸入 4 $^{\circ}$ C 的 4% 多聚甲醛 PBS 过夜固定,然后置于含 20% 蔗糖的多聚甲醛液中,至组织沉下去即可冰冻切片。

1.6 两步法免疫组化制片 组织包埋后,石蜡连续切片,切片厚 4 μ m;60 ~ 80 $^{\circ}$ C 烤片 2 h;切片经常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水;0.01 mol \cdot L⁻¹ PBS 洗 3 次,每

次 3 min;高压修复抗原;将 0.01 mol \cdot L⁻¹ PBS 200 mL 放入高压锅内煮沸放入切片,盖上锅盖继续加热至喷气 1.5 min,冷却后,用 PBS 洗 3 次,每次 3 min;3% 过氧化氢(H₂O₂)溶液室温下孵育 10 min,用 PBS 洗 3 次,每次 3 min;每张切片滴加一抗 50 μ L,置于湿盒内孵育 15 min,用 PBS 洗 3 次;每张切片滴加多聚物 50 μ L 室温下孵育 15 min,用 PBS 清洗 3 次,每次 3 min。滴加双花扁豆凝集素显色液,反应 3 ~ 10 min (在显微镜下观察颜色变化至适合时终止反应);自来水冲洗,苏木精复染,自来水返蓝,中性树胶封片。

1.7 阳性细胞数的确定及计数 Fos 阳性信号在细胞核周围染为浓棕黄色或淡棕色环状。取各组大鼠组织切片,用病理分析仪观察,选取同一部位,在其右上、右下、中央、左上、左下五个视野进行阳性颗粒的计数,取其均数做统计分析。

1.8 统计学方法 实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行处理,两组间均值比较采用 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 侧脑室注射结晶-8 对中枢 Fos 表达的影响 见表 1。

表 1 提示,模型组大鼠脑干、下丘脑、脊髓的 Fos 表达与 0.9% 氯化钠溶液组比较差异有统计学意义(*P*<0.01)。疼痛大鼠经结晶-8 治疗后,高、低剂量组 Fos 表达与模型组比较差异有统计学意义(*P*<0.01)。结晶-8 与罗通定均能减少疼痛大鼠脑干、下丘脑及脊髓 Fos 的阳性表达。

2.2 Fos 阳性细胞在下丘脑、脑干、脊髓的表达结果 经免疫组化染色,疼痛大鼠的下丘脑、脑干、脊髓的 Fos 阳性表达在细胞质、细胞核周围染为棕色,强阳性表达为浓棕黄色,为环状形或椭圆形;模型组阳性颗粒密集,结晶-8 组阳性颗粒较稀少。见图 1。

表 1 侧脑室注射结晶-8 对中枢 Fos 表达的影响

Tab.1 Effect of ICV injection with crystal-8 on the expression of Fos in centra tissue

组别	剂量/(mg \cdot kg ⁻¹)	大鼠/只	脊髓	下丘脑	脑干
结晶-8					
低剂量组	1	6	10.48 \pm 3.09 ^{*1}	12.27 \pm 3.24 ^{*1}	10.84 \pm 2.08 ^{*1}
高剂量组	2	7	6.87 \pm 2.10 ^{*1}	12.49 \pm 2.80 ^{*1}	10.76 \pm 3.66 ^{*1}
罗通定组	2	7	10.08 \pm 3.89 ^{*1}	8.21 \pm 1.75 ^{*1}	9.24 \pm 2.21 ^{*1}
0.9% 氯化钠溶液组	...	7	4.13 \pm 1.49	9.64 \pm 1.81	7.94 \pm 2.66
模型组	...	7	18.36 \pm 5.11 ^{*2}	19.28 \pm 2.42 ^{*2}	20.33 \pm 2.63 ^{*2}

与模型组比较,*t* = -7.75 ~ -5.33, ^{*1}*P* < 0.01; 与 0.9% 氯化钠溶液组比较,*t* = 3.23 ~ 9.96, ^{*2}*P* < 0.01

Compared with the model group, *t* = -7.75 ~ -5.33, ^{*1}*P* < 0.01 ; Compared with 0.9% sodium chloride solution group, *t* = 3.23 ~ 9.96, ^{*2}*P* < 0.01

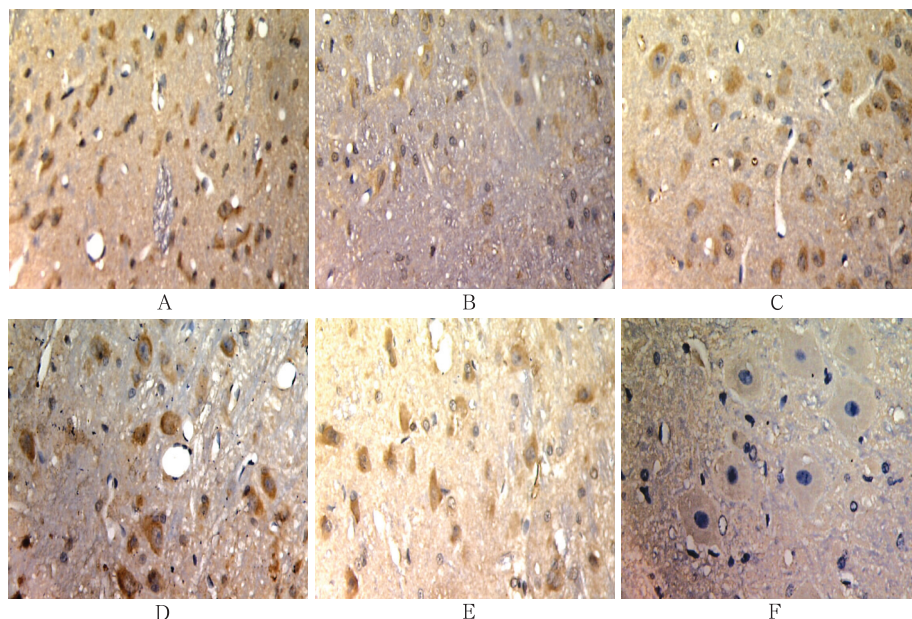


图 1 Fos 阳性细胞在下丘脑、脑干、脊髓的表达

A. 下丘脑模型组; B. 下丘脑结晶-8 高剂量组; C. 脑干模型组; D. 脑干结晶-8 低剂量组; E. 脊髓模型组; F. 脊髓结晶-8 高剂量组 (SP×400)

Fig. 1 The results of Fos expression in brainstem, hypothalamus and spinal cord

A. Model group of hypothalamus; B. High dose of crytal-8 group of hypothalamus; C. Model group of brainstem; D. Low dose of crytal-8 group of brainstem; E. Model group of spinal cord; F. High dose of crytal-8 group of spinal cord (SP×400)

3 讨论

脊髓是痛觉信号进入中枢后的第一级整合中枢, 脊髓背角是疼痛传入系统最重要的组成, 它对痛觉信息的调制至少有突触前的调制, 初级传入末梢的递质释放和突触后调制上行投射神经元的兴奋。对于伤害性刺激后的疼痛传导标志物 c-fos 表达的部位及分布, 研究最多的是脊髓。早在 1987 年, HUNT 等^[5]首次将 c-fos 应用于痛觉研究, 发现伤害性刺激引起的 Fos 免疫阳性反应细胞主要集中于脊髓背角 A₈、C 类神经纤维中止的 I、II、V 层, 而与伤害刺激无关的 III、IV 层则很少有标记细胞。甲醛溶液可以致局部组织炎性反应, 炎性细胞释放炎性递质作用于感受器产生炎性痛, 此时可见脊髓 Fos 免疫神经元增多, 侧脑室给予结晶-8 后, Fos 免疫反应阳性细胞表达数减少。推测结晶-8 发挥镇痛作用与抑制伤害刺激诱导的脊髓 Fos 表达有关。因此观察脊髓 Fos 免疫反应阳性细胞表达可作为伤害性反应神经元的标志。

此外, 下丘脑、脑干作为疼痛的皮质下中枢, 与疼痛的发生有密切的联系。BULLITT 等^[6]首次报道了外周伤害性刺激后, Fos 阳性标记不仅出现于与疼痛相关的核群, 在下丘脑后部、紧邻大脑脚内侧并向背外侧延伸到未定义带。董建江等^[7]研究显示, 疼痛刺激后, 下

丘脑弓状核区、室旁核、室周核 Fos 大量表达。在脑干, 其腹外侧延髓、背侧臂旁核、中脑中央灰质等部位均有恒定的 Fos 免疫反应阳性细胞标记, 中脑中央灰质和中缝隐核涉及伤害性感受的调制过程含有伤害性感受细胞^[6]。此外, TASSORELLI 等^[8]观察到, 在与伤害性感觉与功能整合的脑区: 脑干蓝斑、杏仁中央核、室旁的和室上的下丘脑核、导水管周围灰质等, 经化学刺激后, c-fos 表达异常。本实验结果显示, 受到伤害性刺激后, 脑干、下丘脑 Fos 的表达上调, 两个剂量组的结晶-8 均能下调疼痛大鼠在脑干、下丘脑的 Fos 异常表达。

综上所述, 结晶-8 的镇痛作用可能是通过改善疼痛大鼠在脑干、下丘脑、脊髓的 Fos 异常表达, 从分子水平上初步提示了结晶-8 的镇痛机制。因此认为, 伤害性刺激达到一定程度均可诱发原癌基因在中枢神经系统的表达, 这些表达出现在疼痛相关区域, 结合 Fos 表达的部位、强度等变化可以给探讨痛觉信息的传导通路提供思路。

参考文献

- [1] 马加海, 徐礼鲜. C-fos 原癌基因与痛觉调控[J]. 国外医学: 麻醉学与复苏分册, 2000, 21(3): 141.
- [2] 张亚军. 疼痛分子水平的标志[J]. 国外医学: 麻醉学与复

苏分册,1996,17(4):202-204.

[3] 王希斌,刘华钢. 两面针中木脂素化合物结晶-8 对致痛大鼠脑内 β -内啡肽表达的影响[J]. 中国药理学通报,2009,25(9):1256-1257.

[4] DUBUISSON D, DENNIS S G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats[J]. Pain,1997,4(2):161-374.

[5] HUNT S P, EVANS G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation [J]. Nature, 1987, (328):632-634.

[6] BULLITT E. Induction of c-fos-like protein within the lumbar spinal cord and thalamus of the rat following peripheral stimulation[J]. Brain Res,1989,493(2):391-397.

[7] 董建江,甘子明,张凤兰. 银杏叶影响疼痛大鼠 c-fos 表达的实验研究[J]. 新疆医科大学学报,2008,31(3):254-256.

[8] TASSORELLI C, JOSEPH S A. Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat[J]. Brain Research,1995,682(1-2):167-181.

DOI 10.3870/yydb.2012.09.002

超临界二氧化碳萃取法与水蒸气蒸馏法提取缬草油的化学成分比较*

方颖,丁菲,邬兰,廖鹏程,张慧慧,刘焱文

(湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部重点实验室,武汉 430061)

摘要 目的 对不同提取方法提取的缬草油化学成分进行比较研究。方法 采用超临界二氧化碳(CO₂)萃取法和水蒸气蒸馏法从缬草中提取缬草油,用气相色谱-质谱联用(GC-MS)法进行化学成分定性与相对含量的比较。结果 共鉴定了118种成分,超临界CO₂萃取法提取物共鉴定98种,水蒸气蒸馏法提取鉴定了67种,共有成分47种;超临界CO₂萃取所得缬草油的收率约为水蒸气蒸馏收率的1.8倍。结论 超临界CO₂萃取法是缬草油较好的提取方法。

关键词 缬草;气相色谱-质谱联用法;超临界二氧化碳萃取法;水蒸气蒸馏法

中图分类号 R282.71;R284.2

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)09-1116-06

Comparative Study on Constituents of Valerian Oil from CO₂ Supercritical Fluid Extraction and Steam Distillation Extraction

FANG Ying, DING Fei, WU Lan, LIAO Peng-cheng, ZHANG Hui-hui, LIU Yan-wen (Education Key Laboratory of Chinese Medicine Resources and Chinese Herbal Compound, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

ABSTRACT Objective To comparatively study the chemical constituents of valerian oil which were extracted with different extraction methods. **Methods** Valerian oil was separated from valerian by CO₂ supercritical fluid extraction or steam distillation extraction. Qualitative study on components and comparison of relative contents were carried out by GC-MS. **Results**

A total of 118 chemical constituents were identified, 98 kinds were obtained and identified via a CO₂ supercritical fluid extraction, 67 kinds were through steam distillation extraction, among which 47 kinds of constituents were the same. The yield of valerian oil which was extracted by CO₂ supercritical fluid extraction was 1.8 times of that by the steam distillation extraction.

Conclusion The results show that CO₂ supercritical fluid extraction is more suitable for separating valerian oil.

KEY WORDS *Valeriana officinalis*; GC-MS; CO₂ supercritical fluid extraction; Steam distillation extraction

缬草 (*Valeriana officinalis* L.) 系败酱科缬草属植物,根及根茎为主要入药部位,性平味辛,具有镇静安神、解痉镇痛等功效,可用于治疗心神不安、心悸失眠、癫狂、脏躁、跌打损伤等,长期以来民间一直将其作为镇静药^[1]。缬草含有挥发油、环烯醚萜类、黄酮类、生物碱类等化学成分,其中挥发油为缬草多种药理作用的主要活性成分^[2]。目前从缬草中提取挥发性成分

多采用水蒸气蒸馏 (steam distillation, SD) 与超临界二氧化碳萃取 (supercritical fluid extraction CO₂, SFE-CO₂) 两种方法^[3-4],为了进一步确定最佳提取法,笔者采用超临界 CO₂ 萃取法和水蒸气蒸馏法从缬草中提取缬草油,并用气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 法对提取物进行化学成分定性和定量比较。